

酵素反応機構に関する諸考察 II

大野 公吉

札幌医科大学 生化学教室

Some Kinetic Aspects of Enzymatic Reaction II

By

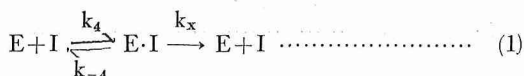
KIMIYOSHI ŌNO

Department of Biochemistry, Sapporo University of Medicine

第 V 章 Inhibitor (阻害体) について^{4, 12)-14)}

阻害体は 2 種に分類される。1) 基質との結合に與る酵素中の原子團と結合して ES 体の形成を阻害するもの。Competitive inhibitor (相競性阻害体) といわれる。2) 酵素の活性中心の或原子團と結合してその触媒作用を阻害するもの。これは酵素と基質の結合を阻害しないので Non-Competitive inhibitor (非相競性阻害体) といわれる。

相競性阻害——酵素と阻害体の結合及び分解を次の如く表わす。



酵素, 基質及び阻害体濃度をそれぞれ e , s_0 及び i_0 にて実験を開始し, 定常状態にあると仮定する。

$$\frac{d(er_i)}{dt} = k_b(e - er_i - ei)s - (k'_{-b} + k_d)er_i = 0 \quad (2) \text{ [註]}$$

$$\frac{d(ei)}{dt} = k_4(e - er_i - ei)i - (k_{-4} + k_x)ei = 0 \quad (3)$$

両式より ei を消去せば次の関係が得られる。

$$\frac{e \cdot r_i}{e - er_i} = \frac{s}{K_m \left(1 + \frac{i}{K_i}\right)} \quad \left(K_m = \frac{k_{-b} + k_d}{k_b}, K_i = \frac{k_{-4} + k_x}{k_4}\right) \quad (4)$$

$$\frac{er_i}{e} = \frac{s}{s + K_{mi}} \quad K_{mi} = K_m \left(1 + \frac{i}{K_i}\right) \quad (5)$$

同様に (2) 及び (3) 式より er_i を消去せば

$$\frac{ei}{e} = \frac{i}{i + K_i \left(1 + \frac{s}{K_m}\right)} \quad (6)$$

となる。

$$V_i = k_d er_i = k_d e \frac{s}{s + K_{mi}} \quad (7)$$

$$V_0 = k_d er = k_d e \frac{s}{s + K_m} \quad (i_0 = 0) \quad (8)$$

$$a = \frac{V_i}{V_0} = \frac{er_i}{er} = \frac{s + K_m}{s + K_{mi}} \quad (9)$$

$$I \frac{a}{a - a'} = K_i + \frac{K_i}{K_m} s \quad (10)$$

(10) 式はまた (6) 式において $\frac{ei}{e} = 1 - a$ とおくこと

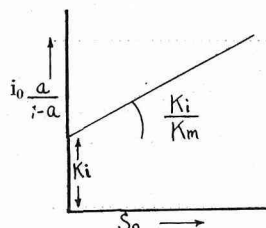
により得られる。従つて

$$a = \frac{V_i}{V_0} = \frac{e - ei}{e} \quad (11)$$

となる。

$$(i_0 - ei) \frac{a}{1 - a} = K_i + \frac{K_i}{K_m} (s_0 - er) \quad (12)$$

$i_0 \gg e$ 且つ $s_0 \gg e$ なる場合には ei 及び er を無視し得る。

$$\begin{aligned} i_0 \frac{a}{1 - a} &= K_i + \frac{K_i}{K_m} s_0 \quad (13) \\ &= K_i + \frac{K_i}{K_m} s_0 \end{aligned}$$


12) Myers, D. K.: Biochem. J. 52, 46 (1952).

13) Straus, O. H. & Goldstein, A.: J. Gen. Physiol. 26, 559 (1943).

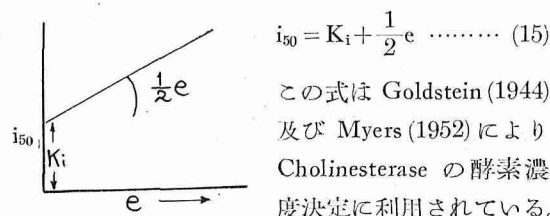
14) Goldstein, A.: J. Gen. Physiol. 27, 529 (1944).

[註] er_i : 阻害体の存在下における ER 体の濃度を表わす。

e が充分大きく, $s \ll K_m$ なる場合には次式が得られる。

$$i_0 = \frac{1-a}{a} K_i + (1-a)e \quad (14)$$

$a = \frac{1}{2}$ 即ち活性度の 50% 阻止をおこす阻害体の濃度を i_{50} とせば次式が得られる。



$$i_{50} = K_i + \frac{1}{2}e \quad (15)$$

この式は Goldstein (1944) 及び Myers (1952) により Cholinesterase の酵素濃度決定に利用されている。

酵素濃度 e 及び基質濃度 s_0 にて実験を開始し、定常状態において阻害体 i_0 を添加せる場合の活性度の時間的变化 $\left(\frac{da}{dt}\right)$ は次の如く考察され得る。

但し ER 体及び EI 体に比して遊離の酵素濃度は極めて小さく零とおき得るものとする。 $(e - er - ei = 0)$ しかれば $a = \frac{er}{e} = \frac{e - ei}{e}$ 且つ $\frac{ei}{e} = 1 - a$ である。

$$\frac{der}{dt} = k_1s(e - er - ei) - (k_{-1} + k_d)er \quad (16)$$

$$\frac{dei}{dt} = k_d(e - er - ei) - (k_{-d} + k_x)ei \quad (17)$$

先ず $\frac{dei}{dt} \gg \frac{der}{dt}$ にして後者を零とおき得る場合には

$$\frac{da}{dt} = -\frac{d(1-a)}{dt} = -\frac{d(ei/e)}{dt} = (k_{-d} + k_x) \left\{ \frac{s'(1-a) - i'a}{s'} \right\} \quad (18)$$

また逆に $\frac{dei}{dt} \ll \frac{ds}{dt}$ にして前者を零とおき得る場合には

$$\frac{da}{dt} = \frac{d(er/e)}{dt} = (k_{-b} + k_d) \left\{ \frac{s'(1-a) - i'a}{i'} \right\} \quad (19)$$

となる。但し $s' = \frac{s}{K_m}$ 且 $i' = \frac{i}{K_i}$ である。ES 体より EI 体を生ずる速度 V は次式にて表わされる。

$$V = \frac{1}{\left(\frac{der}{dt}\right) + \left(\frac{dei}{dt}\right)} \quad (20)$$

従つてまた

$$\frac{da}{dt} = \frac{1}{\left(\frac{der}{dt}\right) + \left(\frac{dei}{dt}\right)} \quad (21)$$

が成立する。Goldstein 及び Myers は (21) 式に (18) 及び (19) 式を導入して次の一般式を得た。

$$\frac{da}{dt} = \frac{s'(1-a) - i'a}{\frac{i'}{k_{-b} + k_d} + \frac{s'}{k_{-d} + k_x}} \quad (22)$$

(22) 式において $\frac{i'}{k_{-b} + k_d} \ll \frac{s'}{k_{-d} + k_x}$ ならば (18) 式その逆ならば (19) 式となる。(18) 式より K_i 及び k_x が既知ならば k_d 及び k_{-d} が求められる。(19) 式よりは K_m 及び k_d が既知ならば k_b 及び k_{-b} が求められる。Myers は實質上 (18) 式を用いて Cholinesterase における酵素と阻害体の結合及び解離速度恒数を求めている。

非相競的阻害——酵素と基質間の結合に無関係に阻害体は酵素と結合してそれを不活性化する。

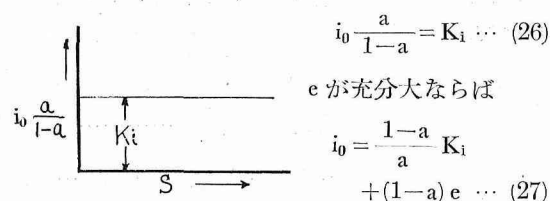
$$\frac{(e - ei)i}{ei} = \frac{k_i}{k_d} = K_i \quad (23)$$

$$a = \frac{V_i}{V} = \frac{e - ei}{e} \quad (24)$$

従つて次式が成立する。

$$i \cdot \frac{a}{1-a} = K_i \quad (25)$$

$i_0 \gg e$ ならば



$$i_0 \frac{a}{1-a} = K_i \quad (26)$$

e が充分大ならば

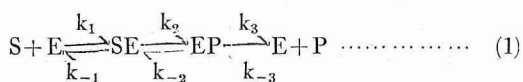
$$i_0 = \frac{1-a}{a} K_i + (1-a)e \quad (27)$$

本式は (14) 式と全く同一であり、適当な阻害体の使用による酵素濃度決定の可能性を示すものである。

第 VI 章 酵素反応過程の一般的考察

酵素反応過程は次の 3 段階に分けられる。

- 1) 結合過程——酵素と基質との結合
- 2) 反応過程——酵素に結合せる基質の生成物への変化
- 3) 遊離過程——酵素に結合せる生成物の遊離



これ等の 3 過程はすべて可逆的であり、6 箇の速度恒数は $S \rightleftharpoons P$ 間の平衡恒数 K と次式により関係づけられる。

$$\frac{k_1 k_2 k_3}{k_{-1} k_{-2} k_{-3}} = K \quad (2)$$

一般に酵素、基質及び生成物濃度 e , s_0 及び p_0 にて実験を開始せる場合次の速度式が得られる。

$$\frac{ds}{dt} = -k_1 s (e - es - ep) + k_{-1} es \quad (3)$$

$$\frac{d es}{dt} = k_1 s (e - es - ep) - (k_{-1} + k_2) es + k_{-2} ep \quad (4)$$

$$\frac{d ep}{dt} = k_2 es - (k_{-2} + k_3) ep + k_{-3} p (e - es - ep) \quad (5)$$

$$\frac{dp}{dt} = k_3 ep - k_{-3} p (e - es - ep) \quad (6)$$

なお次の関係がこれ等の速度式を満足せねばならない。

$$s + es + ep + p = s_0 + p_0 \quad (7)$$

$$\frac{ds}{dt} + \frac{d es}{dt} + \frac{d ep}{dt} + \frac{dp}{dt} = 0 \quad (8)$$

これ等の速度式を直接実験と対比せしめることは可能でないが、第 I 章における如く適当な条件を付與することにより全く同一の速度式が導出される。

1) 定常条件——ES 体及び EP 体の濃度変化は S 及び P の濃度変化に比して極めて小さく零と見做し得ること。

$$\frac{d es}{dt} = 0, \quad \frac{d ep}{dt} = 0 \quad (9)$$

2) 初期条件——通常の酵素実験では酵素と基質のみにて出発する。即ち $p_0 = 0$ である。かかる場合の充分初期の反応速度を考察する場合には、 $p \approx 0$ と見做し得るであらう。従つて (5) 及び (6) 式の $k_3 p (e - es - ep)$ は他の項に比して充分小さく無視し得るであらう。

$$i) \quad p \approx 0, \quad \therefore \quad k_3 p (e - es - ep) \approx 0 \quad (10)$$

また多くの場合 EP 体は ES 体に比して遙かに低濃度である可能性が存する。これは特に第 II 段階 (反応過程) が律速なる場合に成立する。

$$ii) \quad es \gg ep, \quad e - es - ep \approx e - es \quad (11)$$

この際には ES 体が Michaelis 錯合体となる。し

かし第 III 段階 (解離過程) が律速なる場合も可能であらう。

$$iii) \quad ep \gg es, \quad e - es - ep \approx e - ep \quad (12)$$

この際には EP 体が Michaelis 錯合体となる。

3) 濃度条件——通常の酵素実験は高基質低酵素濃度条件で行われる場合が多い。

$$i) \quad s_0 \gg e \quad (13)$$

しかし高酵素低基質濃度実験も可能である。

$$ii) \quad s_0 \ll e \quad (14)$$

(3)~(8)の速度式に (9)~(14) の諸条件を入れることにより次の如き諸関係が得られる。

$$(5), (9) \text{ 及び } (10); \quad ep = \frac{k_2}{k_{-2} + k_3} es \quad (15)$$

$$(4), (9), (11) \text{ 及び } (15); \quad \frac{s(e-es)}{es} = \frac{k_2 k_3 + k_{-1} k_3 + k_{-1} k_{-2}}{k_1 (k_{-2} + k_3)} \quad (16)$$

$$(6), (10) \text{ 及び } (14); \quad V = \frac{dp}{dt} = k_3 ep = \frac{k_2 k_3}{k_{-2} + k_3} es \quad (17)$$

分解恒数及び Michaelis 恒数は次式により定義される。

$$k_d = \frac{k_2 k_3}{k_{-2} + k_3} \quad (18)$$

$$K_m = \frac{k_2 k_3 + k_{-1} k_3 + k_{-1} k_{-2}}{k_1 (k_{-2} + k_3)} = \frac{k_{-1} + k_d}{k_1} \quad (19)$$

(15), (16), (18) 及び (19) 式より

$$V = \frac{k_d}{K_m} s (e - es) = k_d \cdot e \cdot \frac{s}{s + K_m} \quad (20)$$

となり、これに (7), (10) 及び (12) より $s_0 \approx s$ とおけば

$$V = k_d \cdot e \cdot \frac{s_0}{s_0 + K_m} \quad (21)$$

となり、Michaelis Menten 式が得られる。ES 体が ER 体 (Michaelis 錯合体) なりとせば Michaelis 恒数は第 I 章に論じた場合と全く同形であるが、新たに分解恒数の内容が明白にされた。

(11) の代りに (12) の条件を用いても全く同様にして Michaelis Menten 式が得られるが、 k_d 及び K_m の内容は次の如くなる。

$$k_d = k_3 \quad (22)$$

$$K_m = \frac{k_2 k_3 + k_{-1} k_3 + k_{-1} k_{-2}}{k_1 k_2} \quad (23)$$

この際は EP 体が Michaelis 錯合体に相当する。 k_b 及び k_{-b} を次の如く定義せば K_m は全く同一の形式となる。

$$k_b = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} \quad (24)$$

$$k_{-b} = \frac{k_{-1} k_{-2}}{k_{-1} + k_2} \quad (25)$$

また条件 (13) の代りに (14) を適用せば Michaelis 式の代りに次式が得られる。

$$V = k_d s_0 \frac{e}{e + K_m} \quad (26)$$

要するに K_m は一般に次式により表わされる。

$$K_m = \frac{k_{-b} + k_d}{k_b} \quad (27)$$

i) ES 体が Michaelis 錯合体 (ER) の場合。

$$k_b = k_1, \quad k_{-b} = k_{-1}, \quad k_d = \frac{k_2 k_3}{k_{-2} + k_3};$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_d}{k_1} \quad (28)$$

ii) EP 体が Michaelis 錯合体 (ER) の場合。

$$k_b = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2}, \quad k_{-b} = \frac{k_{-1} k_{-2}}{k_{-1} + k_2}, \quad k_d = k_3;$$

$$K_m = \frac{k_2 k_3 + k_{-1} k_3 + k_{-1} k_{-2}}{k_1 k_2} \quad (29)$$

同様にして酵素及び生成物濃度がそれぞれ e 及び p_0 にて逆反応速度を考察せば k_{-d} 及び K_{-m} が次式にて表わされる。

$$K_{-m} = \frac{k_c + k_{-d}}{k_{-c}} \quad (30)$$

i) EP 体が Michaelis 錯合体 (ER) の場合。

$$k_{-c} = k_{-3}, \quad k_c = k_3, \quad k_{-d} = \frac{k_{-1} k_{-2}}{k_2 + k_{-1}};$$

$$K_{-m} = \frac{k_3 + k_{-d}}{k_{-3}} \quad (31)$$

ii) ES 体が Michaelis 錯合体 (ER) の場合。

$$k_{-c} = \frac{k_{-2} k_{-3}}{k_3 + k_{-2}}, \quad k_c = \frac{k_2 k_3}{k_{-2} + k_3}, \quad k_{-d} = k_{-1};$$

$$K_{-m} = \frac{k_2 k_3 + k_{-1} k_3 + k_{-1} k_{-2}}{k_{-2} k_{-3}} \quad (32)$$

かくして次の関係が得られる。

$$k_d/K_m = \frac{k_1 k_2 k_3}{k_2 k_3 + k_{-1} k_3 + k_{-1} k_{-2}} \quad (33)$$

$$k_{-d}/K_{-m} = \frac{k_{-1} k_{-2} k_{-3}}{k_2 k_3 + k_{-1} k_3 + k_{-1} k_{-2}} \quad (34)$$

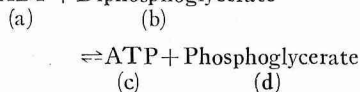
$$\frac{k_d}{k_{-d}} \cdot \frac{K_{-m}}{K_m} = \frac{k_1 k_2 k_3}{k_{-1} k_{-2} k_{-3}} = K \quad (35)$$

(35) 式の関係は 2 種の基質 (S_A 及び S_B) 並びに生成物 (P_C 及び P_D) が存在する場合にも成立する。

$$\frac{k_d}{k_{-d}} \cdot \frac{K_{-mC} K_{-mD}}{K_{mA} K_{mB}} = K \quad (36)$$

これは 3-Phospho-glycerate kinase¹⁵⁾ について実験的に検討されている。

ADP + Diphosphoglycerate



k_d 5.3×10^3 (36) 式により K を求めれば

k_{-d} 6.1×10^2 次の数値が得られる。

K_{ma} 2×10^{-4} $K = 0.54 \times 10^3$

K_{mb} 1.8×10^{-6} これを実験値 3.3×10^3 と比

K_{mc} 1.1×10^{-4} 較せばかなりよく一致して

K_{-d} 2×10^{-1} いると見做し得る。

K 3.3×10^3 酵素反応の全速度は個々

の過程の速度と次式により関係づけられる。

$$V = \frac{1}{\frac{1}{V_1} + \frac{1}{V_2} + \frac{1}{V_3}} - \frac{1}{\frac{1}{V_{-1}} + \frac{1}{V_{-2}} + \frac{1}{V_{-3}}}$$

$$= \frac{1}{\frac{1}{k_1 s e_f} + \frac{1}{k_2 e s} + \frac{1}{k_3 e p}}$$

$$- \frac{1}{\frac{1}{k_{-1} e s} + \frac{1}{k_{-2} e p} + \frac{1}{k_{-3} p e_f}} \quad (37)$$

但し $e_f = e - e s - e p$

今定常状態、この場合は (3), (4), (5) 及び (6) 式において左邊の項は右邊の各項に比して充分小さく零とおき得るもの即ち

$$\frac{ds}{dt} = 0 \quad \frac{des}{dt} = 0 \quad \frac{dep}{dt} = 0 \quad \frac{dp}{dt} = 0$$

と仮定せば次の近似式が得られる。

$$V = \frac{k_1 k_2 k_3 s e_f - k_{-1} k_{-2} k_{-3} p e_f}{k_2 k_3 + k_{-1} k_3 + k_{-1} k_{-2}} \quad (38)$$

初期反応条件即ち $p = 0$ とおくならば

$$V = \frac{k_1 k_2 k_3 s e_f}{k_2 k_3 + k_{-1} k_3 + k_{-1} k_{-2}} \quad (39)$$

が得られる。本式によれば 3 段階の何れが律速段階なるかは k_{-1} と k_2 及び k_{-2} と k_3 間の大小関係に

第 10 表 酵 素 反 應 速 度 式

律 速 段 階	速 度 恒 数	V
な し	$k_{-1} \approx k_2, k_{-2} \approx k_3$	$\frac{k_1 k_2 k_3}{k_1 k_3 + k_{-1} k_3 + k_{-1} k_{-2}} \text{ ser}$
(I)	$k_{-1} \ll k_2, k_{-2} \approx k_3$	$k_1 \text{ ser}$
(II)	$k_{-1} \gg k_2, k_{-2} \ll k_3$	$\frac{k_1 k_2}{k_{-1}} \text{ ser}$
(III)	$k_{-1} \approx k_2, k_{-2} \gg k_3$	$\frac{k_1 k_2 k_3}{k_{-1} k_{-2}} \text{ esr}$
(I) と (II)	$k_{-1} \approx k_2, k_{-2} \ll k_3$	$\frac{k_1 k_2}{k_2 + k_{-1}} \text{ ser}$
(II) と (III)	$k_{-1} \gg k_2, k_{-2} \approx k_3$	$\frac{k_1 k_2 k_3}{k_{-1} k_3 + k_{-1} k_{-2}} \text{ ser}$
(I) と (III)	$k_{-1} \ll k_2, k_{-2} \gg k_3$	$\frac{k_1 k_2 k_3}{k_2 k_3 + k_{-1} k_{-2}} \text{ ser}$

第 11 表 Michaelis 恒数 (K_m) と分解恒数 (k_a)

律 速 段 階	k_b	k_{-b}	k_a	Michaelis 錯合体
な し	k_1	k_{-1}	$\frac{k_2 k_3}{k_{-2} + k_3}$	ES
	$\frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2}$	$\frac{k_{-1} k_{-2}}{k_{-1} + k_2}$	k_3	EP
(I)	k_1	0	$\frac{k_2 k_3}{k_{-2} + k_3}$ 或は k_3	ES 或は EP
(II)	k_1	k_{-1}	k_2	ES
(III)	$\frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2}$	$\frac{k_{-1} k_{-2}}{k_{-1} + k_2}$	k_3	EP
(I) と (II)	k_1	k_{-1}	k_2	ES
(II) と (III)	k_1	k_{-1}	$\frac{k_2 k_3}{k_{-2} + k_3}$	ES
	$\frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2}$	$\frac{k_{-1} k_{-2}}{k_{-1} + k_2}$	k_3	EP
(I) と (III)	$\frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2}$	$\frac{k_{-1} k_{-2}}{k_{-1} + k_2}$	k_3	EP

$$\text{但し } K_m = \frac{k_{-b} + k_a}{k_b}$$

より決定され、反応速度式は第 10 表により表わされる。また Michaelis-Menten 式が成立する場合には K_m 及び k_a は第 11 表の如くである。

(38) 式に (33)~(35) 式を適用せば次式が得られる。

$$V = \frac{k_a}{K_m} s \cdot e_r - \frac{k_{-a}}{K_{-m}} p \cdot e_r \quad (40)$$

$$V = \frac{k_a}{K_m} e_r \left\{ s - \frac{p}{K} \right\} \quad (41)$$

$$V = k_a \cdot e \frac{s}{s + K_m} - k_{-a} e \frac{p}{p + K_{-m}} \\ = k_a \cdot e \frac{s - \frac{p}{K}}{s - \frac{p}{K} + K_m} \quad (42)$$

通常の酵素実験では $K \gg 1$ なる場合が多く、従つて p が相当大きくなるまでは $s \gg \frac{p}{K}$ なる条件が成立し、初期反応速度式が適用され得る。

$$V = \frac{k_d}{K_m} \cdot e \cdot r \cdot s = k_d \cdot e \cdot \frac{s}{s + K_m} \quad (43)$$

また P が S の相競的阻害体と見做し得る場合には第 V 章 (5) 式が適用される。

$$V = k_d \cdot e \cdot \frac{s}{s + K_m \left(1 + \frac{p}{K_{-m}}\right)} \quad (44)$$

更に (7) 式において es 及び ep を無視し得るとせば

$$V = k_d e \cdot \frac{s_0 - p}{s_0 - p + K_m \left(1 + \frac{p}{K_{-m}}\right)} \quad (45)$$

となりこれを積分せば次式が得られる。

$$\int_0^p \frac{s_0 - p + K_m \left(1 + \frac{p}{K_m}\right)}{s_0 - p} dp = \int_0^t k_d e \, dt$$

$$K_m \left(1 + \frac{s_0}{K_{-m}}\right) \ln \frac{s_0}{s_0 - p} + p \left(1 - \frac{K_m}{K_{-m}}\right) = k_d \cdot e \cdot t \quad (46)$$

p を恒数とせば左邊は恒数となる。即ち一定量の生成物が生ずるまでの時間は酵素濃度に反比例する。この関係は (43) 式の代りに (41) 式が適用される場合にも成立し、最大速度 (V_m) の測定とともに一般に酵素濃度の決定に利用され得る。

若し $s_0 \gg p$ 且つ $p \gg K_{-m}$ なる場合には次式が得られる。

$$\int_0^p \frac{s_0 + K_m \left(1 + \frac{p}{K_{-m}}\right)}{s_0} dp = \int_0^t k_d \cdot e \cdot dt$$

$$\frac{K_m}{2 s_0 K_{-m}} p^2 + \frac{s_0 + K_m}{s_0} p = k_d \cdot e \cdot t \quad (47)$$

$$\therefore p = k \sqrt{e \cdot t} \quad (k \text{ は恒数}) \quad (48)$$

即ち通常の高基質濃度実験において生成物の Michaelis 恒数 (K_m) が充分小なる場合には生成物の総量は酵素濃度或いは時間の平方根に比例する (Schütz の法則)。

3 段階の 6 個の速度恒数と実測し得る K_m , K_{-m} , k_d , k_{-d} 及び K との間には (28) (29) (31) (32) 及び (35) の如き関係が存在するが、これより個々の恒数を求めることはなお不可能である。以下これ等の個々の恒数の特徴を考察し、実験値との比較を若干試みてみよう。

結合速度恒数 (k_1 及び k_{-1})——酵素と基質或いは生成物間の結合の 2 次速度恒数にして liter mol⁻¹ second⁻¹ の単位にて表わされる。いわゆる結合速度恒数 k_b 及び k_{-b} は第 II 段階が律速なる場合には k_1 或は k_{-1} に一致する。^(註)

衝突説に基づいて k_1 値の計算を試みよう。1 ml 中に単位濃度にある酵素及び基質分子間の有効衝突数 (Z) は次式にて表わされる。

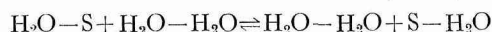
$$Z = \theta (r_E + r_S)^2 \sqrt{8 \pi k T \left(\frac{1}{m_S} + \frac{1}{m_E} \right)} \quad (49)$$

但し r_E 及び r_S は酵素及び基質分子の径、 m_S 及び m_E は分子量、そして θ は酵素の活性中心の面積の酵素表面積に対する割合である。 $r_E \gg r_S$ 且つ $m_E \gg m_S$ とせば (49) 式は次の如く簡単化される。

$$Z = \theta r_E^2 \sqrt{\frac{8 \pi k T}{m_S}} \quad (50)$$

$$k_1 = \frac{N_0}{1000} \theta r_E^2 \sqrt{\frac{8 \pi k T}{m_S}} e^{-\frac{\Delta E^\ddagger}{RT}} \text{ liter mol}^{-1} \text{ second}^{-1} \quad (51)$$

但し上式は気体分子に適用されるもので、酵素及び基質分子は溶媒なる水分子に取り囲まれたなかを分子運動しているわけであるから実際の衝突数はより小さくなるべきである。拡散に預るものは主として基質分子と見做し、且つ酵素と基質間の結合を單なる水素結合のみと仮定せば結合過程は次の如く表わされる。



(拡散)



拡散過程の μ 値は通常 4 Kcal 程度と考えられる。結合過程の ΔE^\ddagger 値も最低 4 Kcal とおき得るであろう。

$r_E = 2 \times 10^{-7} \text{ cm}$, $m_S = 300$ $\theta = \frac{1}{100}$ と仮定せば $T = 300^\circ \text{ K}$ における k_1 値は $10^7 \text{ liter mol}^{-1} \text{ second}^{-1}$ となる。実際には基質分子と酵素分子間の結合には数個の水素結合を含む場合もあり得るし、また Van der Waals 結合も特に長い炭化水素鎖を有する場合に顕著となるであろう。また基質が荷電を有する場合には静電的結合を行う場合もあろう。

[註] しからざる場合にも $k_2 \gg k_{-1}$ 或いは $k_{-2} \gg k_3$ なる場合には $k_b = k_1$ 且つ $k_{-b} = k_{-1}$ が成立する。

従つて $k_1 = 10^7$ なる値は最高限界と見做し得るものと考えられる。

Chance¹⁶⁾ は H_2O_2 と Peroxidase 間の結合速度恒数を直接実測して $k_1 = 1.2 \times 10^7$ を得ている。(51) 式に H_2O_2 の分子量 (34) を入れ、前述せる場合と同様の仮定を適用せば $k_1 = 3 \times 10^7$ が得られる。両者の良き一致は仮定の妥当性を示すものであろう。

Myers (1952)¹²⁾ は (アセチルコリン) - (コリンエステラーゼ) 系に阻害体 (Trimethyl-ammonium bromide の Dimethylcarbamate) を加えて活性度の時間的变化を追求し Goldstein 式 [第 V 章 (22)] により結合及び解離速度恒数の測定を試みた。阻害体の結合速度恒数は 0.2×10^6 またアセチルコリンの k_b は 0.7×10^6 [註] であり、両者がほぼ匹敵する数値なることは $k_b = k_1$ なることを推測せしめる。 $\Delta E^\ddagger = 5$ Kcal と仮定して (51) 式に基づき計算すれば $k_1 = 3 \times 10^6$ が得られ、比較的良い一致が見られる。

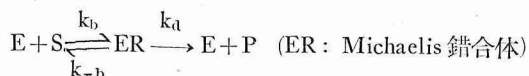
解離速度恒数 (k_{-1} 及び k_{-2}) —— 酵素と結合せる基質或いは生成物が遊離する過程の 1 次の速度恒数である。いわゆる解離速度恒数 k_{-b} 及び k_c は第 II 段階が律速なる場合にのみ k_{-1} 及び k_3 に一致する。Chance (1943)¹⁵⁾ は H_2O_2 - ペルオキシダーゼ系において解離速度恒数は無視し得る程の小値なることを認めた。Meyers (1952)¹²⁾ はコリンエステラーゼにおいて阻害体の解離速度恒数 (k_{-4}) はその分解恒数 (k_x) の 10^{-4} second⁻¹ の値に比して無視し得る程度なることを認めた。アセチルコリンについても $k_a \gg k_{-b}$ なる仮定の下に求めた k_b 値の妥当性は k_{-1} が無視し得る程の小値なることを推測せしめる。しかしすべての酵素反應において k_{-1} と k_2 , 及び k_{-2} と k_3 の大小関係を検討することは現在不可能であるが、これが第 11 表に示せる如く 3 過程のどれが律速であるかを決定する重要な因子として注目されねばならない。

反應過程の速度恒数 (k_2 及び k_{-2}) —— 酵素反應の主体をなす共有結合の変化を含む純粹の化学的变化と見做し得る過程の速度恒数である。通常の化学反應の速度が 10°C の温度上昇に際して 2~3

倍の増加を示し、従つて μ 値は 14,000~22,000 Cal mol⁻¹ であり、 ΔS^\ddagger 値は大略 $-5 \sim -10$ Cal degree⁻¹ mol⁻¹ である。多酵素反應もまたこの範囲の μ 及び ΔS^\ddagger 値を示すことが多いことは、第 2 段階 (反應過程) が律速であり、Michaelis 錯合体は ES 体であり k_a は主として k_2 に依存することを示唆するものであろう。これを支持する重要な事実として Sizer 等⁵⁾ が觀察せる 0°C における μ 値の急激な変化を挙げ得る (第 6 表) 蔗糖水解酵素系においては酵素と基質或いは生成物の結合に 12 個の水素結合を仮定し、且つ水素結合 1 個の解離に $\mu = 5$ Kcal 且つ $\Delta S^\ddagger = 13$ Cal を要するものと仮定せば $\mu_3 = 60,000$ Cal 且つ $\Delta S_3^\ddagger = 156$ Cal の値が得られる。即ち 0°C 以下における律速段階は第 3 過程即ち酵素より生成物が解離する過程であり、分解恒数 k_a は主として k_3 に依存し、 0°C 以上では第 2 過程 (反應過程) が律速段階となり分解恒数 k_a は主として k_2 に依存すると考え得るであろう。Tributylin-lipase 系においては 1 個のエステル結合につき水素結合 2 個及び脂肪酸殘基を C_{18} として C_1 個につき Van der Waals 結合の解離に $\mu = 1.5$ KCal 且つ $\Delta S^\ddagger = 3$ Cal を仮定せば $\mu_3 = 37,000$ Cal 且つ $\Delta S_3^\ddagger = 80$ Cal の値が得られ、同様にして 0°C 以下における律速段階が第 3 過程なることを支持する。Casein-trypsin 系では事情がやや困難であるが反應に與る Peptide 結合以外の酵素基質間の結合の存在を考慮せば同様に解釈し得るであろう。要するに酵素基質間に多数の結合が存在する場合には低温においては解離過程が律速段階となり、Michaelis 錯合体は EP 体となり得る可能性が存する。しかし常温においては多くの酵素反應の律速段階は第 II 過程で Michaelis 錯合体は ES 体となり k_a は大略 k_2 に依存すると見做し得るであろう。

總 括

酵素反應機構は通常次の如く表わされる。



16) Chance, B.: In Modern trends Physiol. and Biochem. (1952).

[註] この値は $k_a \gg k_{-b}$ なる仮定の下に、 $k_b = \frac{k_a}{K_m}$ より算出するものである。

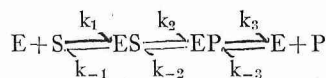
しかして Michaelis 恒数 (K_m) は 3 個の速度恒数と關係づけられる。

$$K_m = \frac{k_{-b} + k_a}{k_b} \quad (k_a \text{ 分解恒数})$$

この際の Michaelis-Menten 式の成立條件が簡単に論議された (第 1 章)。

著者は酵素反應機構を次の可逆的 3 段階に分け

て考察し Michaelis-Menten 式の成立條件を検討した。



かくして K_m 及び k_a と 6 個の速度恒数間に次の關係が得られた。

律速段階	Michaelis 錯合体	k_b	k_{-b}	k_a	K_m
(II)	ES	k_1	k_{-1}	$\frac{k_2 k_3}{k_{-2} + k_3}$	$\frac{k_2 k_3 + k_{-1} k_3 + k_{-1} k_{-2}}{k_1 (k_{-2} + k_3)}$
(III)	EP	$\frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2}$	$\frac{k_{-1} k_{-2}}{k_{-1} + k_2}$	k_3	$\frac{k_2 k_3 + k_{-1} k_3 + k_{-1} k_{-2}}{k_1 k_2}$

6 個の速度恒数の特徴が考察され、実験値との比較検討が試みられた (第 6 章)。

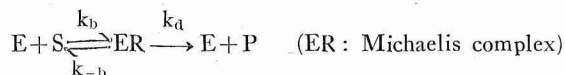
多くの酵素反應の Michaelis 恒数、分解恒数、活性化エネルギー及びエントロピーの数値が第 2

～5 表に集録された (第 2 章)。

酵素反應に及ぼす温度効果、pH の影響及び阻害体の作用機構に關して簡単に論議された (第 3 ～5 章)。
(昭和 28. 6. 20 受付)

Summary

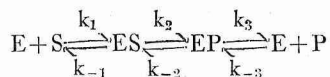
The mechanism of the enzyme reactions is expressed usually as follows.



Michaelis constant (K_m) has a relation with the three apparent velocity constant.

$$K_m = \frac{k_{-b} + k_a}{k_b} \quad (k_a: \text{destructive constant})$$

Author has tried to consider the kinetics of the enzymatic reactions by the following reversible mechanism.



1) The necessary conditions and assumptions for the maintenance of Michaelis-Menten theory were examined.

2) The relations of the four apparent constants with the six velocity constants have been shown as follows.

Rate determining step	Michaelis complex	k_b	k_{-b}	k_a	K_m
second	ES	k_1	k_{-1}	$\frac{k_2 k_3}{k_{-2} + k_3}$	$\frac{k_2 k_3 + k_{-1} k_{-3} + k_{-1} k_{-2}}{k_1 (k_{-2} + k_3)}$
third	EP	$\frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2}$	$\frac{k_{-1} k_{-2}}{k_{-1} + k_2}$	k_3	$\frac{k_2 k_3 + k_{-1} k_3 + k_{-1} k_{-2}}{k_1 k_2}$

3) The six velocity constants have been considered by the collision or transition state theory, and then some comparisons of each theoretical value with experimental values were tried and discussed.

4) The values of Michaelis constant, destructive constant, activation energy and entropy of the several enzyme reactions were tabulated.

5) Some explanations and discussions of the effects of temperature, pH and inhibitors upon the enzymatic kinetics were presented.

(Received June 20, 1953)
